

Karla Cristina Guimarães de Oliveira

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B SOBRE OS PROCESSOS DE
PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO
CAMARÃO DE ÁGUA-DOCE *Macrobrachium olfersii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à disciplina BIO7016 como requisito parcial
para a obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas pela Universidade Federal
de Santa Catarina.

Orientadora: Profa. Dra. Evelise Maria Nazari
Coorientadora: MSc. Heloísa Schramm da
Silva

Florianópolis
2017

Oliveira, Karla Cristina Guimarães de
Efeito da radiação ultravioleta-B sobre os processos de
proliferação e apoptose em células embrionárias do camarão
de água-doce *Macrobrachium olfersii* / Karla Cristina
Guimarães de Oliveira ; orientadora, Evelise Maria Nazari
; coorientadora, Heloísa Schramm da Silva. - Florianópolis,
SC, 2017.
xx+37 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. I. Nazari, Evelise Maria . II.
Silva, Heloísa Schramm da. III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Karla Cristina Guimarães de Oliveira

**EFEITO DA RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA B SOBRE OS PROCESSOS DE
PROLIFERAÇÃO E APOPTOSE EM CÉLULAS EMBRIONÁRIAS DO
CAMARÃO DE ÁGUA-DOCE *Macrobrachium olfersii***

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Licenciado em Ciências Biológicas, e aprovado em sua forma final pela Banca Examinadora.

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Carlos Roberto Zanetti
Coordenador do Curso de Ciências Biológicas

Banca Examinadora

Profa. Dra. Evelise Maria Nazari
Universidade Federal de Santa Catarina
Presidente

Prof. Dr. Renato Hajenius Aché de Freitas
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro

MSc. Eliane Cristina Zeni
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro

Prof. Dr. Carlos José de Carvalho Pinto
Universidade Federal de Santa Catarina
Membro

Aos meus pais, Vidal e Clarice, com todo meu amor e gratidão, por todo incentivo, paciência e apoio ao longo da minha formação, e ao meu filho Lucas, por toda compreensão durante esses anos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Evelise Maria Nazari, pessoa admirável, por ter me acolhido com carinho ao seu grupo de pesquisas no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA), por acreditar na minha capacidade e por toda sua dedicada e impecável orientação. Sem os seus direcionamentos, eu não conseguiria realizar este trabalho. Meu eterno carinho e gratidão.

À MSc. Heloísa Schramm da Silva, amor em pessoa, por toda a paciência, tempo e dedicação destinados a me ajudar no desenvolvimento deste trabalho, pela força nos experimentos e explicações dos programas estatísticos.

À Profa. Dra. Yara Maria Rauh Müller por seus conhecimentos repassados e pelos conselhos sobre a vida docente, durante a monitoria nas aulas de Embriologia.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o meu convite e pelo tempo dedicado para avaliar este trabalho.

Aos professores da graduação por todos os conhecimentos repassados durante os cinco anos e meio de curso.

Ao pessoal do LRDA por terem me recebido tão bem, por todas as experiências trocadas e ajuda que me deram. Em especial à Eliane e Thaline, por todo carinho que sempre tiveram comigo, pelos ensinamentos sobre o desenvolvimento embrionário de *Macrobrachium olfersii* e por estarem sempre dispostas a colaborar.

Aos meus pais, Vidal e Clarice, que sempre foram minhas inspirações e meu porto seguro, por todo o amor incondicional, apoio e paciência, por toda dedicação e esforço para me proporcionarem uma vida mais confortável. Agradeço a vocês por cada palavra que incentivou a continuação dos meus estudos e por terem cuidado do meu filho, com imenso carinho e zelo, enquanto eu me dedicava aos estudos na universidade. Diante de todas as dificuldades que surgiram ao longo desses cinco anos e meio de graduação, agradeço cada conselho, cada abraço e cada demonstração de carinho que tiveram por mim. Com certeza, não chegaria até aqui, se não fosse por vocês, obrigada por sempre acreditarem e confiarem em mim!

Ao meu filho Lucas que foi a maior surpresa e desafio da minha vida, que com seus primeiros dias de vida já se comportava durante quatro aulas seguidas na universidade. Obrigada, meu amor, por sempre ter sido parceiro e paciente, por ter respeitado cada momento meu de concentração e dedicação acadêmica. Você é a minha força, minha motivação e minha esperança do amanhã. Obrigada por ter despertado

em mim o desejo de ser uma mulher-mãe melhor. Você foi surpresa e desafio, mas com certeza, sempre será o melhor presente de toda a minha vida!

Aos meus familiares que suportaram meus momentos de ansiedade nas datas próximas de provas e trabalhos. Saibam que também fizeram parte da minha formação. Em especial, agradeço à minha irmã Karen, que sempre foi compreensível e amiga, que nunca me desmotivou e acreditou em mim até quando eu queria desistir. Todo o meu amor por vocês!

Aos meus colegas de curso que me ajudaram com os trabalhos acadêmicos e que me aturaram durante esses anos. Em especial ao Rafael, Mariana, Simone, Monique, Fabiana, Suzany e Renan, que sempre se fizeram presentes e que são amigos que eu quero manter por toda a vida!

Muito obrigada a todos que me ajudaram, direta ou indiretamente, a tornar este trabalho possível!

“It is not birth, marriage, or death, but gastrulation, which is truly the most important time in your life”.

Lewis Wolpert

RESUMO

O aumento da radiação ultravioleta (RUV) que incide na superfície terrestre está associado à diminuição do ozônio estratosférico e pode afetar os organismos terrestres e aquáticos. Dentre o espectro da RUV que atinge a superfície terrestre, a radiação ultravioleta B (RUVB) é a mais danosa e pode penetrar nos ambientes aquáticos, atingindo embriões, larvas e adultos de espécies que ali habitam. *Macrobrachium olfersii* é um camarão de água-doce que habita águas rasas e transparentes, ficando exposto à radiação durante o seu ciclo de vida. As fêmeas de *M. olfersii* apresentam uma câmara incubadora externa, onde carregam seus embriões, podendo-se supor que a RUVB atinge também os embriões desta espécie. O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da RUVB sobre a morfologia externa dos embriões e os processos de proliferação e apoptose nas células embrionárias de *M. olfersii*. Para tal, foi simulado em laboratório a irradiância de UVB (310 mW/cm^2) que as fêmeas desta espécie recebem durante a época de reprodução no ambiente natural. As fêmeas ovígeras com embriões no sétimo dia do desenvolvimento embrionário (E7) foram irradiadas com uma lâmpada UVB 6W por 30 min. Após a irradiação, essas fêmeas foram mantidas por 24 h e 48 h no escuro e analisadas em E8 e E9, respectivamente. Fêmeas ovígeras não irradiadas com embriões em E8 e E9 foram utilizadas como controle. Adicionalmente, embriões em E8 e E9 obtidos de fêmeas ovígeras coletadas no Parque Municipal da Lagoa do Peri foram utilizados como referência de irradiação UVB no ambiente natural. Os resultados obtidos mostram que os embriões nas duas idades e dos dois grupos expostos à RUVB (laboratório e ambiente) apresentaram alterações na morfologia externa. Além disso, a RUVB induziu diminuição da proliferação celular, tanto na região do lobo óptico quanto da papila caudal, nas idades de E8 e E9. A RUVB promoveu também aumento no número de células em apoptose nas duas regiões embrionárias em E8 e E9. Esses resultados indicam que, mesmo em baixa dose de RUVB, esta radiação induziu alterações nos embriões de *M. olfersii*, sendo esses resultados importantes para considerar as condições reais de exposição dos embriões no ambiente natural, diante das alterações climáticas globais.

Palavras-chave: Radiação UVB; Embrião; Crustáceos; Marcador mitótico; Marcador apoptótico; Mudanças climáticas globais.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Indivíduos adultos de <i>M. olfersii</i>	4
Figura 2 – Embriões de <i>M. olfersii</i> , destacando as regiões embrionárias em vista total	6
Figura 3 – Localização do Parque Municipal da Lagoa do Peri em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil	8
Figura 4 – Embriões de <i>M. olfersii</i> em E7, E8 e E9, destacando as regiões embrionárias em vista total e em secções sagitais com coloração HE	10
Figura 5 – Embriões de <i>M. olfersii</i> em E8 e E9, destacando os tipos de alteração na morfologia externa, após exposição à RUVB, em vista total	14
Figura 6 – Imunomarcacão da proteína FHH3 nos embriões de <i>M. olfersii</i> em E8 e E9	18
Figura 7 – Número total de células imunomarcadas para a proteína FHH3, por área (NA), nos embriões de <i>M. olfersii</i> em E8 e E9	19
Figura 8 – Imunomarcacão da proteína caspase3 nos embriões de <i>M. olfersii</i> em E8 e E9	21
Figura 9 – Número total de células imunomarcadas para a proteína caspase3, por área (NA), nos embriões de <i>M. olfersii</i> em E8 e E9	22
Figura 10 – Detecção de células apoptóticas nos embriões de <i>M. olfersii</i> em E8 e E9 pelo método de TUNEL	23
Figura 11 – Número total de células apoptóticas, por área (NA), reconhecidas pelo método de TUNEL nos embriões de <i>M. olfersii</i> em E8 e E9	24

LISTA DE QUADRO E TABELA

Quadro 1 – Descrição dos grupos propostos para o estudo dos efeitos da RUVB sobre os embriões de *M. olfersii* **9**

Tabela 1 – Porcentagem de alterações na morfologia externa dos embriões de *M. olfersii* em E8 e E9 nos diferentes grupos experimentais **15**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BFC	Bromofluorocarbonos
CFC	Clorofluorocarbonos
DAB	3,3' diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
E	Dia embrionário
EGTA	Ácido tetracético glicol etileno, do inglês <i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
FHH3	Fosfo-histona H3
HE	Hematoxilina e eosina
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
LO	Lobo óptico
LRDA	Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal
N	Tamanho amostral
NA	Número de células por área
O	Átomo livre de oxigênio
O ₂	Molécula de oxigênio
O ₃	Moléculas de ozônio
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate buffered saline</i>
PC	Papila caudal
PEM-FA	Fixador piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico, ácido tetracético glicol etileno, sulfato de magnésio, formaldeído
PIPES	Piperazina-1,4-bis ácido 2-etanosulfônico
RUV	Radiação ultravioleta
RUVA	Radiação ultravioleta A
RUVB	Radiação ultravioleta B
RUVC	Radiação ultravioleta C
TBS	Tampão Tris salino do inglês <i>Tris Buffered</i>
TUNEL	Terminal transferase dUTP nick end labeling, do inglês <i>transferase terminal dUTP nick end labeling</i>
UVB	Ultravioleta B

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	7
2.1. Objetivo geral	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Material biológico	8
3.2. Delineamento dos grupos experimentais	9
3.3. Estagiamento dos embriões	10
3.4. Procedimento de irradiação	11
3.5. Análise da morfologia externa dos embriões	11
3.6. Análise microscópica dos embriões	11
3.6.1. Fixação e inclusão dos ovos	11
3.6.2. Marcações celulares	12
3.6.3. Identificação de células apoptóticas pelo método de TUNEL ...	12
3.7. Quantificação das células em proliferação e em apoptose	12
3.8. Análise dos dados	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
4.1. Alterações na morfologia externa dos embriões induzidas pela RUVB	14
4.2. Efeito da RUVB na proliferação das células embrionárias	17
4.3. Efeito da RUVB na morte celular por apoptose	20
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

O espectro eletromagnético solar é composto por ondas de rádio, micro-ondas, infravermelho, luz visível, radiação ultravioleta (RUV), raios X e raios gama (DIFFEY, 1991). A RUV encontra-se na faixa de comprimento de onda que varia entre 400 a 100 nanômetros (nm), sendo subdividida de acordo com suas propriedades físicas, de comprimento de onda, em três regiões: radiação ultravioleta A (RUVA, 400 – 315 nm), radiação ultravioleta B (RUVB, 315 – 280 nm) e radiação ultravioleta C (RUV, 280 – 100 nm). Contudo, considerando seus efeitos fotobiológicos, uma nova subdivisão foi proposta para a RUV em: RUVA-I (400 – 340 nm), RUVA-II (340 – 320 nm), RUVB (320 – 290 nm) e RUV (290 – 200 nm) (DIFFEY, 1980; 2002).

A intensidade com que a RUV chega à superfície terrestre é diferenciada e sua incidência é controlada pela camada de ozônio estratosférico, a qual é constituída por moléculas de ozônio (O_3) que, por sua vez, são compostas por uma molécula de oxigênio (O_2) e por um átomo livre de oxigênio (O). A atenuação da RUV na camada de ozônio se deve às reações fotoquímicas necessárias ao constante processo de formação e dissociação do ozônio, o qual depende da energia intrínseca da RUV (DIFFEY, 1991; ROWLAND, 2006). Assim, considerando que a quantidade de energia da RUV é inversamente proporcional ao seu comprimento de onda, toda a energia da RUV é utilizada nas reações fotoquímicas na camada de ozônio (SGARBI et al., 2007). Com isso, a RUV não atinge a superfície terrestre (SMITH et al., 1992), enquanto que a RUVA atinge a superfície, pois sua energia é pouco utilizada nessas reações fotoquímicas (BALOGH et al., 2011). Por sua vez, a RUVB, que apresenta comprimento de onda intermediário entre a RUVA e a RUV, é parcialmente atenuada na camada de ozônio (DIFFEY, 2002).

Desse modo, a camada de ozônio atua no controle da incidência da RUV que atinge a superfície terrestre. Com isto, estima-se que a proporção da RUVA que atinge a superfície seja de 90% a 95%, enquanto que a de RUVB seja de 5% a 10%, dependendo da região geográfica e da condição da camada de ozônio (KIRCHHOFF et al., 2000; BROZYNA et al., 2007; D'ORAZIO et al., 2013).

Considerando a importância da camada de ozônio, foram publicados na década de 1970 dois trabalhos clássicos, MOLINA e ROWLAND (1974) e CRUTZEN (1974), os quais demonstraram que a camada de ozônio pode apresentar alterações na sua composição, devido à emissão de compostos clorofluorocarbonos (CFC) e

bromofluorocarbonos (BFC). Esses compostos são fotodissociados pela RUV, liberando moléculas de bromo, flúor e cloro que se ligam ao O e O₂, impedindo a formação de O₃. Com isto, as emissões de CFC e BFC na atmosfera resultam na diminuição do ozônio estratosférico e consequentemente, no aumento dos níveis da RUVB na superfície terrestre (STOLARSKI e CICERONE, 1974; WOFSY et al., 1975; YUNG et al., 1980; MORRISETTE, 1989; SHANKLIN, 2010; MAIONE et al., 2013). Vale destacar, que os pesquisadores CRUTZEN, MOLINA e ROWLAND receberam em 1995 o Prêmio Nobel de Química (www.nobelprize.org) por seus trabalhos sobre a emissão de CFC e BFC e seus impactos no ozônio estratosférico.

Além das alterações na camada de ozônio pela emissão de CFC e BFC, o fenômeno conhecido por buraco de ozônio antártico, descoberto na década de 1980, também contribui para a redução da camada de ozônio (FARMAN et al., 1985), principalmente na região sul da América do Sul, a qual pode se estender para latitudes mais baixas, como a região Sul do Brasil (KIRCHHOFF et al., 2000; DÍAZ et al., 2006; GONZALEZ et al., 2014; PREVIDI e POLVANI, 2014). Esse fenômeno ocorre devido a maiores concentrações de compostos químicos em algumas regiões geográficas, os quais participam das reações fotoquímicas na camada de ozônio que, por consequência, resultam na rarefação do ozônio estratosférico (MEADOR et al., 2002).

As radiações que atingem a superfície terrestre são fundamentais para diversos processos biológicos nos seres vivos. A RUVA fornece energia luminosa para a fotossíntese e para ativação da enzima fotoliase, que atua no reparo celular (SANCAR e SANCAR, 1987; HÄDER et al., 2007), a RUVB é indispensável para a síntese de vitamina D em humanos (BANDEIRA et al., 2006; DIFFEY, 2013) e também para a orientação visual de alguns animais vertebrados e invertebrados (LAND e NILSSON, 2002). No entanto, dependendo da dose recebida da RUV, alguns organismos podem desencadear reações adversas. A RUVA é responsável pelo envelhecimento precoce e pelo surgimento de queimaduras na pele (GALLAGHER e LEE, 2006). Já a RUVB, considerada a mais nociva aos organismos, também pode causar queimaduras na pele, além de desestabilizar o sistema imunológico e induzir alterações no DNA, que podem desencadear câncer de pele e catarata (CADET et al., 2005; MAHMOUD et al., 2008; NASSER, 2010; DUPONT et al., 2013, SOLA e LORENTE, 2015).

A RUVB pode também atingir os ecossistemas aquáticos dependendo da transparência na coluna d'água. Isto porque, a incidência da RUVB na coluna d'água é atenuada pela concentração de matéria

orgânica dissolvida que, por sua vez, absorve a energia do comprimento de onda mais curto da RUVB (KARENTZ e LUTZE, 1990; HÄDER et al., 1998; 2007; BANCROFT et al., 2007; ALTSHULER et al., 2011). Assim, em ambientes de águas transparentes, a RUVB incide em diferentes profundidades (SMITH et al., 1992) e os adultos, larvas e embriões dos animais que ali habitam ficam sujeitos aos seus efeitos fotobiológicos. Além disso, os embriões são classicamente referenciados como sendo mais susceptíveis à RUVB, por não apresentarem mecanismos de defesa completamente desenvolvidos (EPEL, 2003).

Estudos mostraram diminuição significativa nas taxas de sobrevivência em embriões e também alterações no crescimento de larvas de vertebrados e invertebrados aquáticos, quando expostos à RUV (TIETGE et al., 2001; RUELAS et al., 2006; DONG et al., 2007; DAHMS e LEE, 2010; FUKUNISHI et al., 2013). A RUVB provocou alterações comportamentais nas larvas de caranguejos estuarinos (HOVEL e MORGAN, 1999), induziu estresse oxidativo em embriões de copépodes (WON et al., 2014; KIM et al., 2015) e induziu danos ao DNA de embriões e larvas de ouriços do mar (LESSER e BARRY, 2003).

Durante o desenvolvimento embrionário, os processos celulares como a proliferação e a apoptose são essenciais para a formação adequada dos embriões. A proliferação celular é responsável pelo aumento do número de células nos embriões e pela reposição de células quando necessário. Os ciclos mitóticos nas células embrionárias envolvem as fases de crescimento citoplásmico e de duplicação do material genético, que ocorrem de forma mais rápida, quando comparadas às fases do ciclo mitótico de um organismo adulto (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2005; NINOV et al., 2009). Quando a proliferação celular é excessiva, torna-se necessário um balanço entre proliferação e apoptose para a formação e manutenção dos tecidos e órgãos dos embriões (MEIER et al., 2000).

A apoptose é um tipo de morte celular programada, responsável pela remoção de células, durante o desenvolvimento embrionário que, por sua vez, é importante para a formação de tecidos e órgãos (KERR et al., 1972; FADEEL e ORRENIUS, 2005). Além disso, a apoptose envolve alterações morfológicas, como a fragmentação do DNA e a formação de corpos apoptóticos (HAIL et al., 2006; CHI et al., 2014), mediadas pela ativação de diversas proteínas, as quais estão envolvidas em três vias específicas que coordenam os eventos da morte celular programada. Duas dessas vias são denominadas intrínsecas, sendo uma ativada pela geração de espécies reativas de oxigênio e outra em

decorrência de danos ao DNA. A terceira via, denominada extrínseca, é ativada por receptores de morte presentes na superfície celular (DOSEFF, 2004). Essas vias também podem ser induzidas por fatores exógenos abióticos, como a RUVB (KIECHLE e ZHANG, 2002; GRIVICICH et al., 2007; SUZANNE e STELLER, 2013).

A disponibilidade de conhecimento acerca dos mecanismos celulares que, durante o desenvolvimento embrionário, podem ser afetados pela RUVB é consideravelmente escassa. Desse modo, considera-se de suma importância a necessidade da ampliação dos estudos sobre os efeitos fotobiológicos da RUVB em embriões de espécies aquáticas, considerando (i) os diferentes tipos de respostas celulares, (ii) a sensibilidade diferenciada das espécies, (iii) os possíveis comprometimentos nos estágios de vida subsequentes e (iv) os possíveis comprometimentos na dinâmica das populações naturais.

Estudos sobre o desenvolvimento embrionário de camarões de água-doce vêm sendo realizados no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal (LRDA) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (MÜLLER et al., 1999; AMMAR et al., 2001; NAZARI et al., 2003; MÜLLER et al., 2003; 2004). Uma das espécies estudada pelo grupo do LRDA é o camarão de água-doce *Macrobrachium olfersii* (Wiegmann, 1836) (Decapoda, Palaemonidae) (Figura 1). Nos embriões dessa espécie foram observadas algumas alterações induzidas pela RUVB, como alterações na morfologia dos embriões e na pigmentação dos cromatóforos, estresse oxidativo, danos ao DNA, alterações na estrutura e dinâmica funcional das mitocôndrias, entre outras (NAZARI et al., 2010; 2013; ZENI et al., 2015; SILVA, 2015; QUADROS et al., 2016).

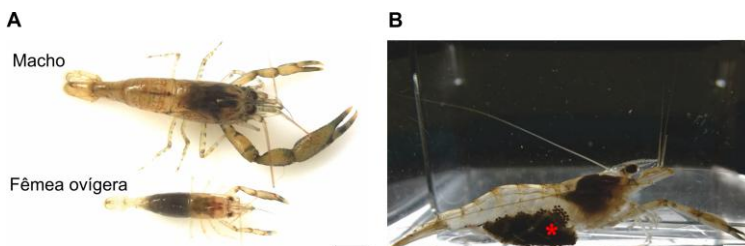


Figura 1 – Indivíduos adultos de *M. olfersii*. Macho e fêmea ovígera em vista superior (A), fêmea ovígera em vista lateral (B). * indica a massa de ovos na câmara incubadora. Barra de escala: 10 mm (A) e 5 mm (B). Autor: Madson Silveira de Melo.

M. olfersii é uma das espécies de camarão de água-doce mais representativa e abundante no sul do Brasil e na Ilha de Santa Catarina (BOND-BUCKUP e BUCKUP, 1989), habita e se reproduz em águas claras e pouco profundas, onde a RUVB atinge com facilidade. Esta espécie apresenta fecundidade média de 1557 ovos (NAZARI et al., 2003), sendo que o desenvolvimento tem duração de 14 dias embrionários (E), em temperatura de 24°C (± 1) (SIMÕES-COSTA et al., 2005) e os ovos são do tipo centrolécitos, com clivagem meroblástica superficial (MÜLLER et al., 2004). Outra característica de *M. olfersii* é que as fêmeas desta espécie apresentam uma câmara incubadora externa, localizada na região ventral do abdome, para alojamento dos seus numerosos ovos, durante todo o desenvolvimento embrionário (AMMAR et al., 2001).

Entre os dias embrionários E1 a E3, os embriões passam pelas fases de clivagem e gastrulação, que possibilita a organização do disco germinativo, o qual contém os três folhetos embrionários. Em E4, organiza-se o nauplius embrionizado, constituído pelos lobos ópticos, apêndices naupliares e papila caudal. A partir de E5-E6 inicia a organização do pós-nauplius embrionizado, caracterizado pelo crescimento e diferenciação das estruturas naupliares, precursoras de todas as estruturas e órgãos do embrião. A partir de E7 inicia a pigmentação dos olhos, o aparecimento dos cromatóforos e a bifurcação dos apêndices. Nesta idade, devido ao seu dobramento, a papila caudal aproxima-se da região equatorial do ovo. Em E8, os lobos ópticos são bem evidentes, visto que ocorre o crescimento da área pigmentada dos olhos e a papila caudal atinge a região equatorial do ovo. A partir de E9, inicia-se a diferenciação dos omatídeos dos olhos, os quais apresentam um grande aumento de tamanho. A papila caudal cresce e ocupa a região sobre os lobos ópticos. Entre E10 e E14 ocorre um aumento no número dos cromatóforos e inicia-se a segmentação da papila caudal, que resultará abdome do embrião, além disso, ocorre também a organização da carapaça e a maturação dos órgãos (SIMÕES-COSTA et al., 2005) (Figura 2).

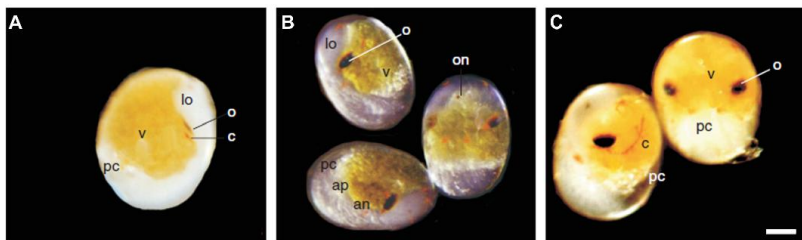


Figura 2 – Embriões de *M. olfersii*, destacando as regiões embrionárias em vista total. Embrião em E7 (A), E8 (B) e E9 (C). an, apêndices naupliares; ap, apêndices pós-naupliares; c, cromatóforo; lo, lobo óptico; o, olho; on, olho naupliar; pc, papila caudal; v, vitelo. Barra de escala: 0,1 mm. Fonte: adaptado de SIMÕES-COSTA et al. (2005).

Assim, considerando o breve panorama descrito, este trabalho de conclusão de curso aborda os impactos da RUVB em embriões de *M. olfersii*, buscando compreender as repostas celulares frente à radiação artificial e à radiação solar natural, sendo esta última importante para o reconhecimento do impacto realístico da RUVB. A estação reprodutiva dessa espécie ocorre nos meses de verão, quando os índices de RUVB são os mais altos, segundo os dados do Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE), é provável que os embriões recebam doses elevadas de RUVB e que essas comprometam o seu desenvolvimento. Assim, a hipótese desse estudo é a de que a RUVB provoca alterações no desenvolvimento embrionário, promovendo uma diminuição na proliferação e induzindo um aumento na morte celular por apoptose das células embrionárias de *M. olfersii*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o efeito da RUVB sobre a morfologia externa dos embriões, bem como sobre os processos de proliferação e apoptose nas células embrionárias do camarão de água-doce *M. olfersii*.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a morfologia das estruturas embrionárias visíveis externamente;

Quantificar a expressão da proteína fosfo-histona H3 (FHH3), como marcador mitótico, nas células embrionárias;

Verificar a ocorrência de apoptose nas células embrionárias, bem como quantificar a expressão da proteína caspase3, envolvida no processo de apoptose;

Interpretar o balanço entre a proliferação e apoptose nas células embrionárias.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material biológico

Machos, fêmeas e fêmeas ovíferas do camarão de água-doce *M. olfersii* foram coletados no Parque Municipal da Lagoa do Peri (Figura 3), Florianópolis, Santa Catarina, Brasil (Autorização Permanente IBAMA nº 15294-1/2008). Este local foi escolhido por ser um manancial de água-doce para a população humana da Ilha de Santa Catarina e por ser livre da ação antrópica (CECA/FNMA, 1996; LISBOA et al., 2011). A captura foi realizada entre os meses de agosto de 2015 a novembro de 2016, com auxílio de puçás (malha de 0,5 cm), que foram passados entre a vegetação e as pedras submersas. Após coletados, os camarões foram transportados para o LRDA/BEG/UFSC, em aquários portáteis com capacidade de 16 L. Em laboratório, os camarões foram mantidos em aquários com capacidade de 60 L, em condição de aeração constante, ciclo claro:escuro de 12 h: 12 h com lâmpada fluorescente Philips TLT 40 W/75 RS, em temperatura de 24°C (± 1). Os camarões foram alimentados diariamente com ração para organismos aquáticos (Alcon Bottom Fish®), em pequenas bandejas para controle de consumo. Para viabilizar a realização de cópula e a obtenção de fêmeas ovíferas, os camarões foram mantidos na proporção de 1 macho: 3 fêmeas. Para o estudo do efeito da RUVB foram utilizados embriões provenientes das fêmeas que ficaram ovíferas em laboratório, bem como embriões obtidos das fêmeas ovíferas coletadas na Lagoa do Peri.

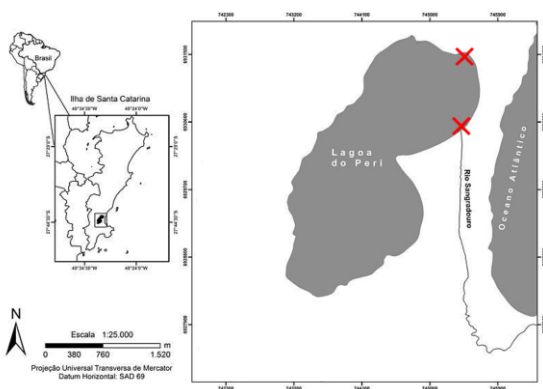


Figura 3 – Localização do Parque Municipal da Lagoa do Peri em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. X indica os pontos de coleta. Fonte: adaptado de STICCA (2013).

3.2. Delineamento dos grupos experimentais

Foram organizados seis grupos experimentais, os quais estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1 – Descrição dos grupos propostos para o estudo dos efeitos da RUVB sobre os embriões de *M. olfersii*.

Grupo	Dia embrionário – irradiação	Tempo pós irradiação (h)*	Dia embrionário – análise	Finalidade
UVB	E7	24	E8 (n ≅ 45 embriões/3 fêmeas)	Verificar se a RUVB, em condições controladas de laboratório, induz alterações na morfologia externa e nos processos de proliferação e apoptose nas células embrionárias.
		48	E9 (n ≅ 45 embriões/3 fêmeas)	
Ambiente	-	-	E8 (n ≅ 45 embriões/3 fêmeas)	Verificar o impacto da RUVB solar na morfologia externa e nos processos de proliferação e apoptose nas células embrionárias.
			E9 (n ≅ 45 embriões/3 fêmeas)	
Controle	-	-	E8 (n ≅ 45 embriões/3 fêmeas)	Avaliar a morfologia externa e os processos de proliferação e apoptose em embriões obtidos em laboratório e não irradiados com RUVB.
			E9 (n ≅ 45 embriões/3 fêmeas)	

* Tempos definidos de acordo com ZENI et al. (2015) e QUADROS et al. (2016).

3.3. Estagiamento dos embriões

Para o reconhecimento dos estágios do desenvolvimento foi adotado o estagiamento por dia embrionário (E), onde cada dia embrionário corresponde a um intervalo de 24 h (SIMÕES-COSTA et al., 2005). Amostras com 20 ovos por fêmea ovígera foram retiradas para o reconhecimento das características externas dos embriões ao estereomicroscópio (Olympus SHZ10, 35X a 70X). Como características morfológicas foram consideradas a presença dos lobos ópticos e dos olhos, dos apêndices corporais e papila caudal. Neste estudo, foram utilizados embriões em E7, E8 e E9. Essas idades foram escolhidas devido ao fato de que os embriões são formados por poucas camadas celulares, que compõem estruturas embrionárias bem definidas e reconhecíveis externamente (Figura 4).

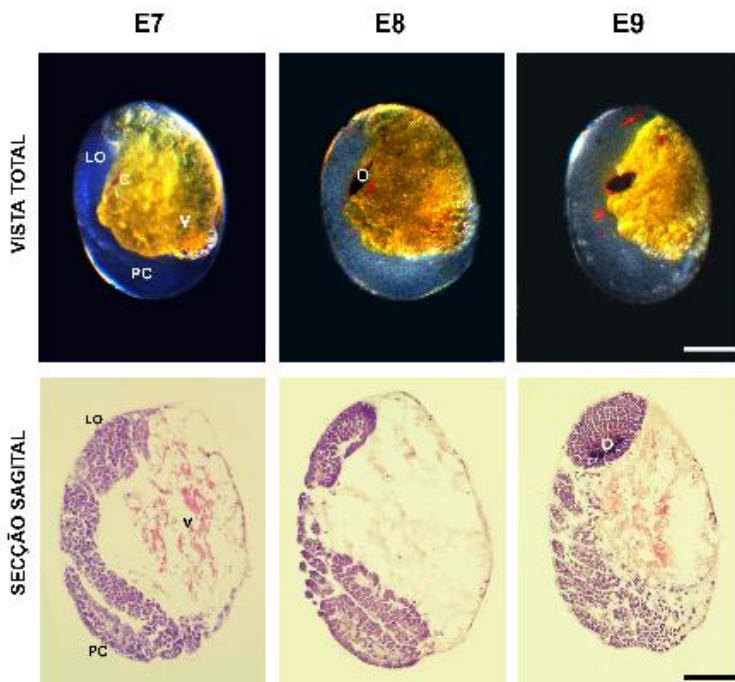


Figura 4 – Embriões de *M. olfersii* em E7, E8 e E9, destacando as regiões embrionárias em vista total e em seções sagitais com coloração HE. C, cromatóforo; LO, lobo óptico; O, olho; PC, papila caudal; V, vitelo. Barra de escala da vista total: 0,1 mm e da secção sagital: 200 µm.

3.4. Procedimento de irradiação

Para o procedimento de irradiação foi utilizada a metodologia proposta por NAZARI et al. (2010), onde as fêmeas ovígeras, com embriões em E7, obtidas em laboratório foram transferidas para um aquário de 16 L, desprovido de abrigos, equipado com lâmpada Ultravioleta B (UVB) de 6 W (Vilber Lourmat) e irradiadas por 30 min, com irradiância de 310 mW/cm^2 . A irradiância utilizada em laboratório simula a irradiância média natural, a qual as fêmeas ovígeras estão expostas durante a estação reprodutiva na Ilha de Santa Catarina. Após a irradiação, as fêmeas ovígeras foram mantidas em um aquário escuro por 24 h e 48 h, quando foram analisadas em E8 e E9, respectivamente.

3.5. Análise da morfologia externa dos embriões

Foi realizada amostragem de ovos ($n = 20$ ovos/fêmea) para o reconhecimento das características externas dos embriões ao estereomicroscópio (Olympus SHZ10, 35X a 70X), bem como para a caracterização e quantificação de possíveis alterações morfológicas induzidas pela RUVB. Para isso, foram considerados os parâmetros: opacidade do embrião, pigmentação dos olhos e dos cromatóforos e distribuição da massa de vitelo.

3.6. Análise microscópica dos embriões

3.6.1. Fixação e inclusão dos ovos

Os ovos em E8 e E9 foram fixados em solução PEM-FA (tampão PIPES 0,1M + EGTA 2,0 mM + MgSO_4 1,0 mM + formaldeído 3,7%; pH 6,9) (SCHOLTZ et al., 1994) por 30 min à temperatura ambiente. Após a fixação, os ovos foram mantidos em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline*) (Na_2HPO_4 + NaH_2PO_4 + KCl + NaCl + H_2O destilada, 0,1M, pH 7,4 a 4°C). Em seguida, os ovos foram submetidos a banhos em solução crioprotetora de sacarose a 5% e 15% por 3 h a 4°C e em solução de sacarose a 30% por 24 h a 4°C (ZENI et al., 2015). A inclusão dos ovos foi realizada com meio de montagem Tissue Tek® a -25°C e os cortes seriados na espessura de 6 μm foram obtidos em criostato Leica CM 1850 UV, sendo os cortes organizados em lâminas tratadas com poli-L-lisina e identificados pelo grupo experimental. Após a montagem, as lâminas foram mantidas a 4°C para preservação dos cortes. Parte das lâminas foi destinada às análises por imuno-histoquímica e a outra parte para as análises pelo método de TUNEL. Para controle histológico e verificação da integridade dos tecidos e células, foi realizada coloração com Hematoxilina-Eosina (HE).

3.6.2. Marcações celulares

Para verificar a presença das proteínas envolvidas nos processos de proliferação e apoptose foi realizada a técnica de imuno-histoquímica, utilizando anticorpos primários e secundários específicos. As lâminas foram lavadas em água corrente por 3 vezes à temperatura ambiente para a remoção do meio de montagem. Em seguida, os cortes foram tratados com H_2O_2 : metanol 100% (1:2) por 10 min para a inativação das peroxidases endógenas. Os cortes foram permeabilizados em tampão PBS + Triton X-100 a 0,3% por 30 min e tratados com soro fetal bovino a 5% por 40 min. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários anti-FHH3 (marcador mitótico; desenvolvido em coelho) e anti-caspase3 (marcador apoptótico; desenvolvido em coelho), durante a noite a 4°C. Após, os cortes foram lavados 2 vezes com tampão PBS + Triton X-100 a 0,3% por 45 min e incubados com anticorpos secundários anti-coelho conjugado à peroxidase (para o anticorpo FHH3) e anti-coelho biotilado conjugado à peroxidase (para o anticorpo caspase3) durante 3 h à temperatura ambiente. A detecção das marcações foi feita com DAB (3,3'diaminobenzidina). Posteriormente, os cortes foram desidratados em série crescente de etanol e diafanizados com xilol. As lâminas foram finalizadas com Entelan®. Os controles negativos da reação por imuno-histoquímica foram realizados da mesma forma, suprimindo-se apenas a incubação com os anticorpos primários, os quais foram substituídos por tampão PBS.

3.6.3. Identificação de células apoptóticas pelo método de TUNEL

As lâminas foram submetidas a banhos de água corrente para a remoção do meio de montagem. Em seguida foram lavadas com TBS (do inglês *Tris Buffered Saline*; 0,1M, pH 7,4). A permeabilização das membranas celulares foi feita com proteinase K diluída em tampão Tris 10 mM, pH 8,0 (1:400). O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado com metanol: peróxido (9:1). Para a reação de equilíbrio e marcação as lâminas foram incubadas com a enzima de marcação (TdT DNA Fragmentation Detection kit) a 37°C em câmara úmida por 1 h e 30 min. A detecção das marcações foi feita com DAB e as células foram contracoradas com verde de metila. As lâminas foram finalizadas com Entelan®.

3.7. Quantificação das células em proliferação e em apoptose

As células em proliferação e em apoptose foram quantificadas com o auxílio da gráticula de Weibel (FREERE e WEIBEL, 1967), com

área conhecida de 36 mm^2 , acoplada ao microscópio de luz (Olympus CBA) (adaptado de MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). As quantificações foram realizadas nos embriões seccionados no plano sagital, sendo amostrada uma área de graticula que abrange o lobo óptico e outra área de graticula para a papila caudal. Para quantificar as células FHH3-positivas e as caspase3-positivas foi utilizado o aumento de 400X e para as células TUNEL-positivas foi utilizado o aumento de 1000X.

3.8. Análise dos dados

As alterações morfológicas e as marcações celulares foram fotodocumentadas ao esteromicroscópio Olympus SHZ10 (35X a 70X) e ao microscópio Nikon 80i (200X a 1000X). Os resultados quantitativos foram organizados em gráficos e tabelas, sendo os dados avaliados no programa estatístico Statistica versão 13.0 para Windows. Para verificar a existência de diferenças significativas entre as médias dos grupos analisados foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey, sendo considerado significativo o valor de $p < 0,05$. Os resultados foram apresentados em média (\pm desvio padrão). Para o cálculo do tamanho amostral de cada análise quantitativa foi utilizada a fórmula $n = (1,96.s)/l$, onde s = desvio padrão de uma amostra inicial e l = 10% da média da amostra inicial (BUSSAB e MORETTIN, 2004).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Alterações na morfologia externa dos embriões induzidas pela RUVB

Na análise da morfologia externa dos embriões foram observadas alterações na opacidade do embrião, na pigmentação dos olhos e dos cromatóforos e na distribuição do vitelo dos grupos UVB e ambiente (Figura 5).

Nos embriões em E8, a RUVB induziu opacidade em 1,7% dos embriões do grupo UVB e nos embriões do grupo ambiente não foi observado esse tipo de alteração (Tabela 1). Por sua vez, na idade E9, a porcentagem de embriões opacos foi mais alta, tanto no grupo UVB (46,7%), quanto no grupo ambiente (31,7%). Na pigmentação dos olhos foram observadas alterações apenas nos embriões em E9, sendo 35,0% no grupo ambiente e 30,0% no grupo UVB. A porcentagem de alterações na pigmentação dos cromatóforos em E8 foi de 25,0% nos embriões do grupo ambiente e 5,0% nos do grupo UVB. Em E9, 83,3% do grupo ambiente apresentou pigmentação anormal nos cromatóforos e, neste caso, não houve nenhuma alteração nos embriões analisados do grupo UVB. Na distribuição do vitelo, ocorreu alteração nos embriões do grupo UVB (8,3%) em E8 e nos embriões do grupo ambiente (5,0%) em E9.

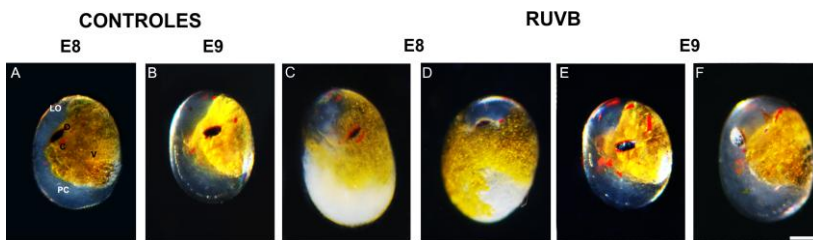


Figura 5 – Embriões de *M. olfersii* em E8 e E9, destacando os tipos de alteração na morfologia externa, após exposição à RUVB, em vista total. Embriões controles em E8 e E9 (A, B), embrião em E8 com opacidade (C), embrião em E8 com alteração na distribuição do vitelo (D), embrião em E9 com alteração na pigmentação dos cromatóforos (E), embrião em E9 com alteração na pigmentação do olho (F). C, cromatóforo; LO, lobo óptico; O, olho; PC, papila caudal; V, vitelo. Barra de escala: 0,1 mm.

Tabela 1 – Porcentagem de alterações na morfologia externa dos embriões de *M. olfersii* em E8 e E9 nos diferentes grupos experimentais.

		Opacidade do embrião	Pigmentação dos olhos	Pigmentação dos cromatóforos	Distribuição do vitelo
	Controle	0,0	0,0	0,0	0,0
E8	Ambiente	0,0	0,0	25,0	0,0
	UVB	1,7	0,0	5,0	8,3
	Controle	0,0	0,0	0,0	0,0
E9	Ambiente	31,7	35,0	83,3	5,0
	UVB	46,7	30,0	0,0	0,0

Os resultados mostram que os embriões coletados no ambiente apresentaram os mesmos tipos de alterações que os embriões dos grupos irradiados em laboratório. Essa similaridade, quanto aos tipos de alteração, pode estar relacionada ao fato de que a irradiância utilizada em laboratório simula, conforme o esperado, a radiação recebida no ambiente natural.

A diferença de porcentagem das alterações morfológicas observadas nas duas idades, dos embriões coletados no ambiente, pode ser explicada em função do tempo e da intensidade de exposição solar nos embriões. Observa-se que os embriões em E9 apresentaram maior diversidade e porcentagem de alterações, quando comparados aos embriões em E8. Isso pode estar relacionado ao tempo de exposição à RUVB, à incidência recebida pelos embriões e também às características da idade embrionária, visto que, nos embriões em E9, o número de células é maior e a maturação dos tecidos encontra-se mais avançada. Essas características apresentadas pelos embriões em E9 permitem melhor visualização das alterações induzidas pela RUVB.

Já quando analisados os embriões dos grupos irradiados em laboratório, também se podem observar diferenças na diversidade e porcentagem das alterações, quando comparadas as duas idades. As amostras analisadas em E9 apresentaram maior porcentagem de opacidade nas células embrionárias do que as amostras analisadas em E8. Isso pode estar relacionado ao intervalo de tempo de análise após a irradiação (24 h e 48 h), onde após 48 h da irradiação (E9), a visualização das alterações torna-se mais evidente. Além disso, também foram observadas alterações na pigmentação dos olhos em E9, mas não foram encontradas em E8. Supõe-se que, neste caso, seja por causa do tamanho do olho (maior número de omatídeos), visto que, em E9 o mesmo apresenta-se maior do que em E8, possibilitando melhor visualização das características embrionárias.

Nos embriões irradiados em laboratório, a menor frequência de alterações na pigmentação dos cromatóforos pode estar relacionada à dose de RUVB recebida pelos embriões, bem como aos tempos de análise após a irradiação. Analisando os resultados obtidos nos embriões do ambiente, pode-se deduzir que a alta porcentagem dessas alterações, a qual foi maior em E9, tenha sido reflexo de uma exposição maior à RUVB. GOUVEIA et al., (2004), utilizando uma dose de RUVB 10 vezes menor do que a utilizada no presente trabalho, relataram que a RUVB não induziu alterações na pigmentação dos cromatóforos do camarão *Palaemonetes argentinus* e do caranguejo *Chasmagnathus granulata*, imediatamente após a exposição em laboratório. Já NAZARI et al. (2010), utilizando a mesma dose do presente trabalho, mostraram alterações na pigmentação dos cromatóforos de *M. olfersii*, mesmo decorridos 4 dias da exposição à RUVB. Assim, considerando as comparações acima estabelecidas, sugere-se que as alterações nos cromatóforos dos embriões apresentem caráter dose e tempo dependentes.

Poucos são os estudos realizados com embriões de camarões que abordem os efeitos da RUVB na morfologia externa durante o desenvolvimento. Entretanto, em outras espécies aquáticas já foram observadas alterações morfológicas induzidas pela RUVB. O estudo feito por DONG et al. (2007) mostrou que embriões de peixes apresentaram alterações na morfologia, quando irradiados com UVB. ADAMS e SHICK (2001) relataram que a RUVB causou malformação e atraso no desenvolvimento embrionário em ouriços do mar e BONAVENTURA et al. (2006) também mostraram anormalidades morfológicas em embriões de ouriços do mar induzidas pela RUVB. Já, alterações relacionadas à morfologia do olho expostos à RUVB foram relatadas em caranguejos adultos por MIGUEL et al. (2002), bem como por VARGAS et al. (2010). Esses estudos mostram que a RUVB compromete a morfologia externa dos organismos expostos e os danos encontrados são variados. Vale destacar que, embora a irradiação utilizada em laboratório simule a irradiância de UVB solar recebida pelos embriões no ambiente, as alterações morfológicas externas observadas nos embriões irradiados em laboratório não refletem a intensidade real de RUVB solar. Essas alterações podem, com uma dose maior de exposição à RUVB, comprometer a funcionalidade dos sistemas orgânicos dos embriões e resultar em larvas com estruturas e órgãos não viáveis, o que potencialmente poderia afetar a dinâmica populacional de *M. olfersii* na Lagoa do Peri.

4.2. Efeito da RUVB na proliferação das células embrionárias

Após identificação das alterações na morfologia externa dos embriões de *M. olfersii*, foram realizadas análises de marcações celulares por imuno-histoquímica, a fim de verificar as alterações induzidas pela RUVB na expressão da proteína FHH3, envolvida no processo de proliferação celular. A quantificação da proliferação celular, nas regiões embrionárias do lobo óptico (LO) e da papila caudal (PC), mostrou que a expressão dessa proteína nos embriões dos grupos analisados em E8 foi semelhante aos analisados em E9.

A expressão da FHH3 no LO foi menor nos embriões em E8 do grupo UVB, os quais apresentaram em média $5,9 (\pm 2,1; p < 0,05)$ células positivas/mm², enquanto que os do grupo ambiente apresentaram $6,3 (\pm 2,2; p < 0,05)$ células positivas/mm² e os do grupo controle $9,3 (\pm 2,4)$ células positivas/mm² (Figura 6). Em E9, os embriões do grupo UVB apresentaram $6,5 (\pm 2,0; p < 0,05)$ células positivas/mm², os do grupo ambiente $6,4 (\pm 1,9; p < 0,05)$ células positivas/mm² e os do grupo controle $9,0 (\pm 2,2)$ células positivas/mm² para a região do LO.

Na região da PC, a expressão da FHH3 foi menor nos embriões em E8 do grupo ambiente, nos quais foram encontradas em média $7,5 (\pm 1,6; p < 0,05)$ células positivas/mm². Enquanto que, nos embriões do grupo UVB a média encontrada foi de $7,9 (\pm 1,7; p < 0,05)$ células positivas/mm² e nos do grupo controle $10,1 (\pm 2,3)$ células positivas/mm². Em E9, a menor expressão da FHH3 na PC foi observada nos embriões do grupo UVB, a qual foi de $7,2 (\pm 1,8; p < 0,05)$ células positivas/mm², já nos do grupo ambiente foi de $8,2 (\pm 2,6; p < 0,05)$ células positivas/mm² e nos do grupo controle $10,9 (\pm 3,1)$ células positivas/mm².

A expressão da FHH3 também foi verificada somando-se os resultados obtidos da região do LO e da PC nos embriões das duas idades analisadas. Em E8, os embriões do grupo ambiente apresentaram uma média de $13,9 (\pm 2,8; p < 0,05)$ células positivas/mm² e os embriões do grupo UVB apresentaram $13,8 (\pm 2,6; p < 0,05)$ células positivas/mm², enquanto que os do grupo controle apresentaram $19,5 (\pm 3,2)$ células positivas/mm² (Figura 7). Em E9, a menor expressão dessa proteína foi encontrada nos embriões do grupo UVB, a qual foi de $13,7 (\pm 2,7; p < 0,05)$ células positivas/mm². Nos embriões do ambiente a média foi $14,6 (\pm 3,4; p < 0,05)$ células positivas/mm² e nos do controle foi $19,9 (\pm 3,6)$ células positivas/mm².

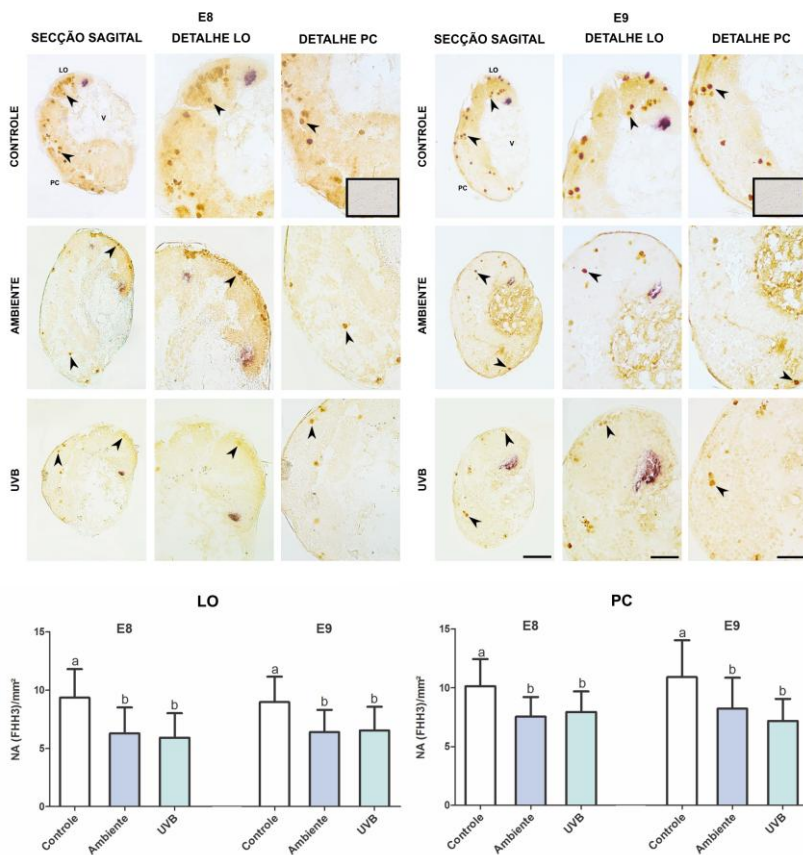


Figura 6 – Imunomarcção da proteína FHH3 nos embriões de *M. ofersii* em E8 e E9. Gráficos mostram o número de células em proliferação por área (NA). Setas indicam as células imunomarcadas. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Insertos nas fotos mostram o controle negativo da reação imuno-histoquímica. Letras minúsculas sobre as barras dos gráficos indicam diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$. Barra de escala: 100 μ m (nas secções sagitais) e 50 μ m nos detalhes do LO e da PC.

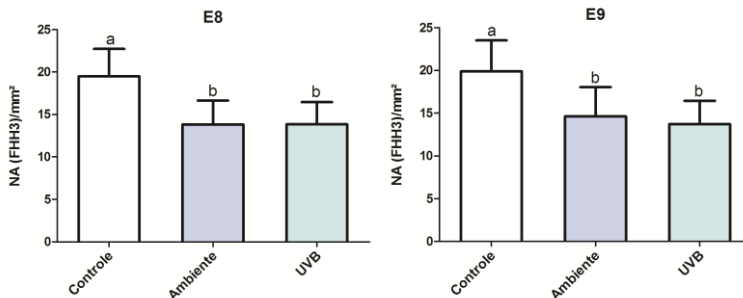


Figura 7 – Número total de células imunomarcadas para a proteína FHH3, por área (NA), nos embriões de *M. olfersii* em E8 e E9. Letras minúsculas sobre as barras dos gráficos indicam diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$.

Analisando os resultados obtidos relacionados à expressão da proteína FHH3, pode-se observar que a RUVB induziu alterações no processo de proliferação celular. HOLLMANN et al. (2016), em um estudo com caranguejos, realizaram ensaios por imuno-histoquímica e relataram que o número de células mitóticas diminuiu nos grupos irradiados com RUVB. No presente estudo, o mesmo pôde ser observado com as células embrionárias de *M. olfersii*, as quais apresentaram um número menor de marcações celulares nos embriões em E8 e E9 coletados na Lagoa do Peri e nos irradiados em laboratório. NAZARI et al. (2010; 2013) e ZENI et al. (2015), utilizando a mesma irradiância de UVB, também mostram diminuição na proliferação celular em embriões de *M. olfersii*. Contudo, o presente trabalho apresenta o diferencial de analisar os efeitos da RUVB por região embrionária.

Considerando os trabalhos existentes, a expectativa inicial era de que a RUVB atingisse de forma semelhante tanto a região do LO, quanto a região da PC. Entretanto, os resultados obtidos indicam que o LO aparentemente foi mais afetado, porque apresentou menor número de células em proliferação. Apesar disso, não é seguro afirmar que esta região foi mais afetada, pois o tamanho do LO é menor do que o da PC, ou seja, o LO apresenta menor número de células embrionárias, o que poderia justificar o menor número de marcações nesta região. Assim, tanto a região do LO quanto a da PC foram comprometidas de maneira semelhante. Vale destacar ainda que, como a proliferação celular é essencial para os eventos de morfogênese e organogênese, interferências nesse processo podem prejudicar o desenvolvimento adequado dos

embriões, visto que as estruturas derivadas do LO e da PC podem apresentar tamanhos menores e formatos alterados, devido ao menor número de células em proliferação. Entretanto, torna-se necessário a realização de estudos complementares, analisando idades embrionárias mais avançadas, a fim de elucidar esses possíveis efeitos nas estruturas.

4.3. Efeito da RUVB na morte celular por apoptose

Nas marcações por imuno-histoquímica observa-se que a expressão da proteína caspase3 no LO dos embriões em E8 apresentou maior número de marcações no grupo UVB, sendo em média de $10,7 (\pm 2,8; p < 0,05)$ células positivas/mm². O grupo ambiente apresentou $10,1 (\pm 2,7; p < 0,05)$ células positivas/mm² e o grupo controle $8,2 (\pm 2,2)$ células positivas/mm² (Figura 8). No LO dos embriões em E9, a maior expressão dessa proteína também ocorreu no grupo UVB, a qual foi de $10,2 (\pm 2,6; p < 0,05)$ células positivas/mm². No grupo ambiente a média foi de $9,4 (\pm 2,4; p < 0,05)$ células positivas/mm² e no grupo controle $8,1 (\pm 2,1)$ células positivas/mm².

Na região da PC dos embriões em E8 o maior número de marcações da caspase3 ocorreu no grupo UVB, sendo de $11,9 (\pm 2,4; p < 0,05)$ células positivas/mm². No grupo ambiente foi de $10,6 (\pm 2,6; p < 0,05)$ células positivas/mm² e no controle de $8,2 (\pm 2,2)$ células positivas/mm². Nos embriões em E9, o grupo UVB teve $11,6 (\pm 2,6; p < 0,05)$ células positivas/mm², enquanto que o grupo ambiente teve $11,5 (\pm 2,9; p < 0,05)$ células positivas/mm² e o controle $9,4 (\pm 2,7)$ células positivas/mm² na região da PC.

Os resultados obtidos da expressão da caspase3 nas células da região do LO e da PC também foram somados e analisados ao total. Em E8, o grupo UVB teve em média $22,6 (\pm 2,7; p < 0,05)$ células positivas/mm², enquanto que o grupo ambiente apresentou $20,7 (\pm 3,3; p < 0,05)$ células positivas/mm² e o grupo controle $16,4 (\pm 2,6)$ células positivas/mm² (Figura 9). Em E9, a média de marcações nos embriões do grupo UVB foi de $21,8 (\pm 2,4; p < 0,05)$ células positivas/mm², no grupo ambiente foi de $21,0 (\pm 3,4; p < 0,05)$ células positivas/mm² e no grupo controle $17,4 (\pm 3,0)$ células positivas/mm².

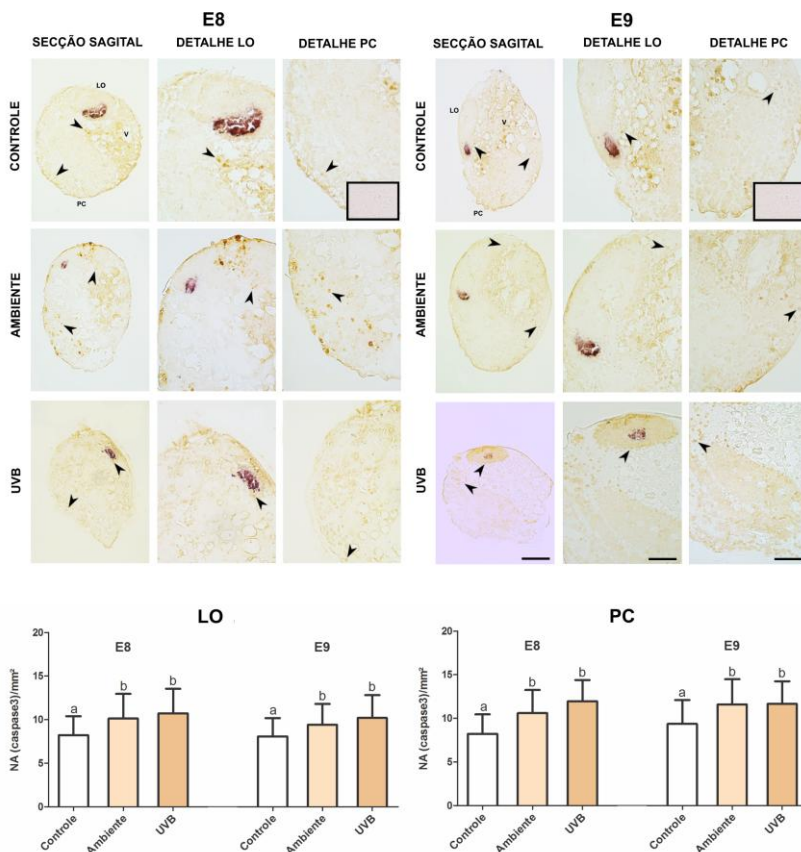


Figura 8 – Imunomarcção da proteína caspase3 nos embriões de *M. olearii* em E8 e E9. Gráficos mostram o número de células em apoptose por área (NA). Setas indicam as células imunomarcadas. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Inseros nas fotos mostram o controle negativo da reação imuno-histoquímica. Letras minúsculas sobre as barras dos gráficos indicam diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$. Barra de escala: 100 μ m (nas secções sagitais) e 50 μ m nos detalhes do LO e da PC.

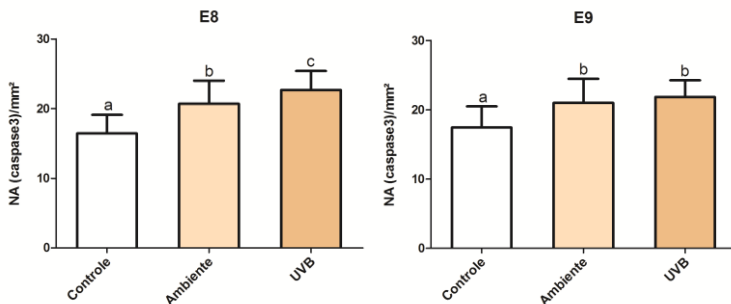


Figura 9 – Número total de células imunomarcadas para a proteína caspase3, por área (NA), nos embriões de *M. olfersii* em E8 e E9. Letras minúsculas sobre as barras dos gráficos indicam diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$.

Nos resultados obtidos pelo método de TUNEL, as marcações celulares apoptóticas na região do LO dos embriões em E8 também foram maiores no grupo UVB, sendo em média $3,6 (\pm 1,1; p < 0,05)$ células positivas/mm². No grupo ambiente a média foi de $3,5 (\pm 1,3; p < 0,05)$ células positivas/mm² e no grupo controle de $2,2 (\pm 0,9)$ células positivas/mm² (Figura 10). Nos embriões em E9, o grupo UVB apresentou $3,9 (\pm 1,2; p < 0,05)$ células positivas/mm², enquanto que o grupo ambiente teve $3,7 (\pm 1,0; p < 0,05)$ células positivas/mm² e o grupo controle $2,4 (\pm 0,8)$ células positivas/mm² na região do LO.

Na região da PC dos embriões em E8, o número de marcações celulares foi maior no grupo UVB, sendo de em média $5,2 (\pm 1,4; p < 0,05)$ células positivas/mm². Enquanto que o grupo ambiente teve $5,0 (\pm 1,2; p < 0,05)$ células positivas/mm² e o grupo controle $2,8 (\pm 0,9)$ células positivas/mm². Nos embriões em E9, o grupo ambiente apresentou mais marcações celulares na região da PC, sendo em média de $5,8 (\pm 1,4; p < 0,05)$ células positivas/mm², enquanto que o grupo UVB apresentou uma média de $5,5 (\pm 1,5; p < 0,05)$ células positivas/mm² e o grupo controle de $3,0 (\pm 1,1)$ células positivas/mm².

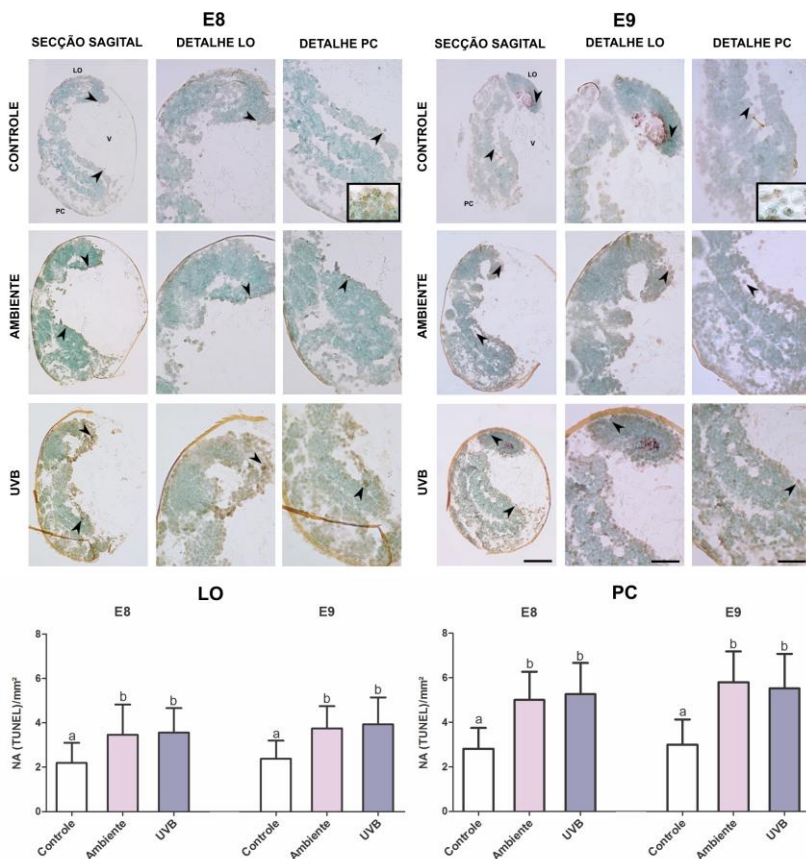


Figura 10 – Detecção de células apoptóticas nos embriões de *M. olearii* em E8 e E9 pelo método de TUNEL. Gráficos mostram o número de células em apoptose por área (NA). Setas indicam as células imunomarcadas. LO, lobo óptico; PC, papila caudal; V, vitelo. Insertos nas fotos mostram o detalhe da marcação. Letras minúsculas sobre as barras dos gráficos indicam diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$. Barra de escala: 100 μ m (nas secções sagitais) e 50 μ m nos detalhes do LO e da PC.

Os resultados obtidos pelo TUNEL da região do LO e da PC também foram somados e analisados separadamente por idade. Nos embriões em E8, o grupo UVB teve em média $8,8 (\pm 1,8; p < 0,05)$ células positivas/mm², enquanto que o grupo ambiente teve $8,5 (\pm 1,7; p < 0,05)$ células positivas/mm² e o grupo controle $5,0 (\pm 1,1)$ células positivas/mm² (Figura 11). Nos embriões em E9, o maior número de marcações foi observado no grupo ambiente, o qual foi de $9,5 (\pm 1,2; p$

$< 0,05$) células positivas/mm². No grupo UVB, a média foi de 9,4 ($\pm 1,4$; $p < 0,05$) células positivas/mm² e no grupo controle de 5,4 ($\pm 1,1$) células positivas/mm².

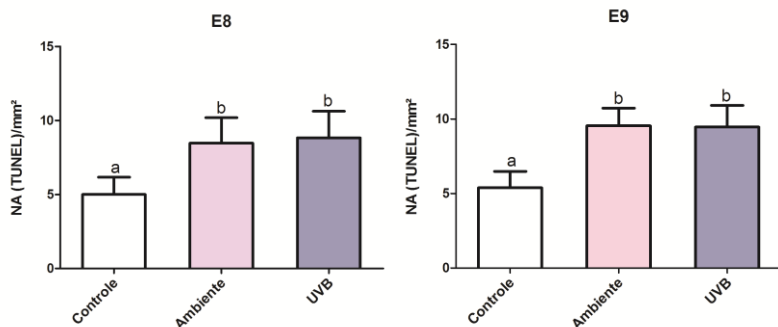


Figura 11 – Número total de células apoptóticas, por área (NA), reconhecidas pelo método de TUNEL nos embriões de *M. olfersii* em E8 e E9. Letras minúsculas sobre as barras dos gráficos indicam diferença significativa entre os grupos $p < 0,05$.

A apoptose é um mecanismo celular que controla o número de células na morfogênese e organogênese quando a proliferação celular é excessiva, durante o desenvolvimento embrionário (DOSEFF, 2004). Além disso, também serve como um meio de manutenção da integridade dos tecidos dos organismos quando estes são expostos a estímulos extrínsecos que promovem danos às células (ZHOU e STELLER, 2003). A caspase3 é uma das proteínas envolvidas na cascata dos múltiplos eventos que desencadeiam a apoptose, sendo a última das caspases a ser ativada, promovendo a clivagem do DNA e a formação dos corpos apoptóticos (COHEN, 1997).

Durante o desenvolvimento, observa-se uma condição estável de equilíbrio dinâmico, controlado por mecanismos de regulação, dessa forma, o balanço entre proliferação e morte celular é mantido. Assim, quando um dano ocorre nas células, a apoptose pode ser desencadeada para evitar a transmissão desse dano para as células filhas, evitando prejuízos maiores nos tecidos e órgãos dos indivíduos (DOSEFF, 2004). Entretanto, como as divisões celulares acontecem rapidamente (NINOV et al., 2009), nem sempre um organismo consegue eliminar um dano e o mesmo é repassado durante os processos mitóticos.

Observando os dados obtidos nesse trabalho, pode-se dizer que a RUVB alterou o processo de morte celular por apoptose nas células

embrionárias, visto que a expressão da caspase3 e a ocorrência de apoptose apresentaram-se maiores nos embriões expostos à RUVB dos dois grupos analisados (laboratório e ambiente) nas duas idades. Além disso, foram verificadas também marcações celulares indicando apoptose nos embriões do grupo controle, contudo, isso pode ocorrer devido ao processo natural de apoptose no desenvolvimento embrionário, que independe do insulto da RUVB (ALBERTS et al., 2011).

A mesma expectativa inicial para a expressão da FHH3 foi também para a caspase3. Contudo, na região da PC constatou-se um maior número de células em apoptose, nos embriões dos dois grupos expostos à RUVB, o que indicaria que essa região foi mais afetada. Entretanto, como o tamanho da PC é maior que o LO, obviamente o número de marcações celulares seria maior na PC, por isso não se pode afirmar que a PC foi a região mais afetada.

Estudos também revelaram danos causados pela RUVB em organismos aquáticos. SINGH et al. (2015) relataram aumento na fragmentação do DNA de peixes, LESSER et al. (2003) mostraram indução à apoptose em células embrionárias de ouriços do mar, KIM et al. (2015) mostraram indução ao estresse oxidativo em embriões de copépodes e HOLLMANN et al. (2015; 2016) relataram aumento de estresse oxidativo e aumento da proteína P53 em caranguejos expostos à RUVB. Esses estudos mostram que a RUVB pode induzir a apoptose por vias celulares distintas em diferentes organismos e em diferentes estágios de vida.

Numa análise geral dos processos de proliferação e apoptose, dos embriões em E8 e E9, foi observado que os grupos expostos à RUVB apresentaram maior número de células em apoptose e menor número de células em proliferação, quando comparados aos respectivos controles. A similaridade dos resultados obtidos entre as duas idades pode ser explicada pelo pequeno intervalo de tempo entre E8 e E9, que é de 24 h. A similaridade dos resultados obtidos entre as regiões do LO e da PC pode ser explicada em virtude das células de ambas as regiões encontrarem-se no mesmo momento do desenvolvimento embrionário, o qual compreende à organogênese e morfogênese iniciais (MÜLLER et al., 2003; 2004). Além disso, constatou-se que a irradiância UVB utilizada em laboratório é similar a do ambiente, porém a dose induzida no laboratório é considerada baixa frente à dose recebida no ambiente. Com os resultados do presente trabalho, verificou-se que baixa dose de RUVB foram capazes de provocar alterações nos embriões de *M. olfersii*, pois a irradiância induzida no laboratório promoveu um

desequilíbrio no balanço entre proliferação e apoptose das células embrionárias dessa espécie.

Considerando todos os resultados, a hipótese do presente estudo foi aceita, visto que puderam ser observados danos induzidos pela RUVB na morfologia externa de *M. olfersii*, bem como diminuição na proliferação e aumento na ocorrência de apoptose nas células embrionárias expostas à radiação. Além disso, ressalta-se a importância dos ensaios realizados com os embriões coletados do ambiente que serviram para verificar se os procedimentos laboratoriais estavam de acordo com a realidade a qual os embriões de *M. olfersii* estão expostos. Assim, os resultados obtidos neste trabalho são importantes para considerar as condições reais de exposição dos embriões no ambiente natural, diante das alterações climáticas globais e do aumento da incidência de RUVB que atinge a superfície terrestre.

Espera-se ainda que este trabalho possa colaborar com futuros estudos envolvendo os efeitos fotobiológicos da RUVB em organismos que vivem no ambiente aquático, no qual esta radiação penetra com facilidade, dependendo da turbidez na coluna d'água. Vale ressaltar que estudos que abordem essa temática devem ser incentivados, considerando que esses organismos são essenciais para a manutenção da biodiversidade aquática e que a rarefação na camada de ozônio é considerada um problema ambiental.

5. CONCLUSÕES

As análises realizadas neste trabalho mostraram que a RUVB induziu:

- alterações na morfologia externa dos embriões de *M. olfersii*, de forma mais expressiva naqueles em E9 obtidos do ambiente, como opacidade dos embriões, alteração na pigmentação dos olhos e dos cromatóforos e na distribuição do vitelo nos ovos;

- diminuição no número de células em proliferação celular, tanto na região do LO quanto na região da PC dos embriões irradiados em laboratório e dos coletados no ambiente;

- aumento no número de células em apoptose, das regiões do LO e da PC, tanto nos embriões expostos em laboratório quanto nos embriões coletados no ambiente.

De um modo geral, a RUVB promoveu alterações semelhantes nas duas idades analisadas e nas duas regiões embrionárias, tanto nos embriões do laboratório quanto nos embriões do ambiente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, N. L.; SHICK, J. M. Mycosporine-like amino acids prevent UVB-induced abnormalities during early development of the green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Marine Biology*, v. 138, n. 2, p. 267-280, 2001.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Fundamentos da Biologia Celular. 3ª Ed, Editora Artmed, Porto Alegre, 864 pp., 2011.

ALTSHULER, I.; DEMIRI, B.; XU, S.; CONSTANTIN, A.; YAN, N. D.; CRISTESCU, M. E. An integrated multi-disciplinary approach for studying multiple stressors in freshwater ecosystems: *Daphnia* as a model organism. *Integrative and Comparative Biology*, v. 51, n. 4, p. 623-633, 2011.

AMMAR, D.; MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Biologia reprodutiva de *Macrobrachium olfersii* (Wiegman) (Crustacea, Decapoda, Palaemonidae) coletados na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 18, n. 2, p. 529-537, 2001.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4, p. 732-742, 2011.

BANCROFT, B. A.; BAKER, N. J.; BLAUSTEIN, A. R. Effects of UVB radiation on marine and freshwater organisms: a synthesis through meta-analysis. *Ecology Letters*, v. 10, n. 4, p. 332-345, 2007.

BANDEIRA, F.; GRIZ, L.; DREYER, P.; EUFRAZINO, C.; BANDEIRA, C.; FREESE, E. Vitamin D deficiency: a global perspective. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia and Metabologia*, v. 50, n. 4, p. 640-646, 2006.

BONAVENTURA, R.; POMA, V.; RUSSO, R.; ZITO, F.; MATRANGA, V. Effects of UV-B radiation on development and hsp70 expression in sea urchin cleavage embryos. *Marine Biology*, v. 149, n. 1, p. 79-86, 2006.

BOND-BUCKUP, G.; BUCKUP, L. Os Palaemonidae de águas continentais do Brasil meridional (Crustacea, Decapoda). *Revista Brasileira de Biologia*, v. 49, n. 4, p. 883-896, 1989.

BROZYNA, A.; ZBYTEK, B.; GRANESE, J.; CARLSON, J. A.; ROSS, J.; SLOMINSKI, A. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Review of Dermatology*, v. 2, n. 4, p. 451-469, 2007.

BUSSAB, W. O.; MORETTIN, P. A. *Estatística Básica*. 5ª Ed, Editora Saraiva, São Paulo, 526 pp., 2004.

CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 571, n. 1, p. 3-17, 2005.

CECA/FNMA. Uma cidade numa ilha: relatório sobre os problemas socioambientais da Ilha de Santa Catarina. 2ª Ed, Editora Insular, Florianópolis, 247 pp., 1996.

Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE). Disponível em: < <http://www.cptec.inpe.br/>>. Acesso em: janeiro de 2017.

CHI, X.; KALE, J.; LEBER, B.; ANDREWS, D. W. Regulating cell death at, on, and in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 1843, n. 9, p. 2100-2113, 2014.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal*, v. 326, n. 1, p. 1-16, 1997.

CRUTZEN, P. J. Estimates of possible variations in total ozone due to natural causes and human activities. *Ambio*, p. 201-210, 1974.

DAHMS, H. U.; LEE, J. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology*, v. 97, p. 3-14, 2010.

DÍAZ, S.; CAMILIÓN, C.; DEFERRARI, G.; FUENZALIDA, H.; ARMSTRONG, R.; BOOTH, C.; PALADINI, A.; CABRERA, S.; CASICCIA, C.; LOVENGREEN, C.; PEDRONI, J.; ROSALES, A.; ZAGARESE, H.; VERNET, M. Ozone and UV radiation over Southern

South America: climatology and anomalies. Photochemistry and Photobiology, v. 82, n. 4, p. 834-843, 2006.

DIFFEY, B. L. Ultraviolet radiation physics and the skin. Physics in Medicine and Biology, v. 25, n. 3, p. 405-426, 1980.

DIFFEY, B. L. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. Physics in Medicine and Biology, v. 36, n. 3, p. 299-328, 1991.

DIFFEY, B. L. What is light? Photodermatology, Photoimmunology and Photomedicine, v. 18, n. 2, p. 68-74, 2002.

DIFFEY, B. L. Modelling vitamin D status due to oral intake and sun exposure in an adult British population. British Journal of Nutrition, v. 23, p. 1-9, 2013.

DONG, Q.; SVOBODA, K.; TIERSCH, T. R.; MONROE, W. T. Photobiological effects of UVA and UVB light in zebrafish embryos: evidence for a competent photorepair system. Journal of Photochemistry and Photobiology B, v. 88, p. 137-146, 2007.

D'ORAZIO, J.; JARRETT, S.; AMARO-ORTIZ, A.; SCOTT, T. UV radiation and the skin. International Journal of Molecular Sciences, v. 14, n. 6, p. 12222-12248, 2013.

DOSEFF, A. I. Apoptosis: the sculptor of development. Stem Cells Development, v. 13, n. 5, p. 473-483, 2004.

DUPONT, E.; GOMEZ, J.; BILODEAU, D. Beyond UV radiation: a skin under challenge. International Journal of Cosmetic Science, v. 35, p. 224-232, 2013.

EPEL, D. Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences. Evolution and Development, v. 5, n. 1, p. 83-88, 2003.

FADEEL, B.; ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. Journal of Internal Medicine, v. 258, n. 6, p. 479-517, 2005.

FARMAN, J. C.; GARDINER, B. G.; SHANKLIN, J. D. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO_x/NO_x interaction. *Nature*, v. 315, p. 207-210, 1985.

FREERE, R. H.; WEIBEL, E. R. Stereologic techniques in microscopy. *Journal of the Royal Microscopical Society*, v. 87, n. 1, p. 25-34, 1967.

FUKUNISHI, Y.; BROWMAN, H. I.; DURIF, C. M.; BJELLAND, R. M.; SHEMA, S. D.; FIELDS, D.; SKIFTESVIK, A. Sub-lethal exposure to ultraviolet radiation reduces prey consumption by Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Marine Biology*, v. 160, p. 2591-2596, 2013.

GALLAGHER, R. P.; LEE, Tim K. Adverse effects of ultraviolet radiation: a brief review. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, v. 92, n. 1, p. 119-131, 2006.

GONZALEZ, P.L.M.; POLVANI, L.M.; SEAGER, R.; CORREA, G.J.P. Stratospheric ozone depletion: a key driver of recent precipitation trends in South Eastern South America. *Climate Dynamics*, v. 42, n. 7-8, p. 1775-1792, 2014.

GOUVEIA, G. R.; LOPES, T. M.; NEVES, C. A.; NERY, L. E. M.; TRINDADE, G. S. Ultraviolet radiation induces dose-dependent pigment dispersion in Crustacean chromatophores. *Pigment Cell Research*, v. 17, n. 5, p. 545-548, 2004.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. Morte celular por apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HÄDER, D. P.; KUMARB, H. D.; SMITH, R. C.; WORRESTD, R. C. Effects on aquatic ecosystems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 46, n. 1, p. 53-68, 1998.

HÄDER, D. P.; KUMAR, H. D.; SMITH, R. C.; WORREST, R. C. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 6, n. 3, p. 267-285, 2007.

HAIL, N.; CARTER, B. Z.; KONOPLEVA, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis*, v. 11, n. 6, p. 889-904, 2006.

HOLLMANN, G.; DE JESUS FERREIRA, G.; GEIHS, M. A.; VARGAS, M. A.; NERY, L. E. M.; LEITÃO, Á.; LINDEN, R.; ALLODI, S. Antioxidant activity stimulated by ultraviolet radiation in the nervous system of a Crustacean. *Aquatic Toxicology*, v. 160, p. 151-162, 2015.

HOLLMANN, G.; LINDEN, R.; GIANGRANDE, A.; ALLODI, S. Increased p53 and decreased p21 accompany apoptosis induced by ultraviolet radiation in the nervous system of a Crustacean. *Aquatic Toxicology*, v. 173, p. 1-8, 2016.

HOVEL, K. A.; MORGAN, S. G. Susceptibility of estuarine crab larvae to ultraviolet radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 237, p. 107-125, 1999.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Biologia celular e molecular*. 8ª Ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 332 pp., 2005.

KARENTZ, D.; LUTZE, L.H. Evaluation of biologically harmful ultraviolet radiation in Antarctica with a biological dosimeter designed for aquatic environments. *Limnology and Oceanography*, v.35, p. 549-561, 1990.

KERR, J. F. R; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, v. 26, n. 4, p. 239-256, 1972.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta*, v. 326, n. 1, p. 27-45, 2002.

KIM, B. M.; RHEE, J. S.; LEE, K. W.; KIM, M. J.; SHIN, K. H.; LEE, S. J.; LEE, Y. M.; LEE, J. S. UV-B radiation-induced oxidative stress and p38 signaling pathway involvement in the benthic copepod *Tigriopus japonicus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, v. 167, p. 15-23, 2015.

KIRCHHOFF, V. W. J. H.; ECHER, E.; LEME, N. P.; SILVA, A. A. A variação sazonal da radiação ultravioleta solar biologicamente ativa. *Brazilian Journal of Geophysics*, v. 18, n. 1, p. 63-74, 2000.

LAND, M. F.; NILSSON, D. E. *Animal Eyes*. 2^a Ed, Oxford University Press, Oxford, 244 pp., 2002.

LESSER, M. P.; BARRY, T. M. Survivorship, development, and DNA damage in echinoderm embryos and larvae exposed to ultraviolet radiation (290–400 nm). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 292, n. 1, p. 75-91, 2003.

LESSER, M. P.; KRUSE, V. A.; BARRY, T. M. Exposure to ultraviolet radiation causes apoptosis in developing sea urchin embryos. *Journal of Experimental Biology*, v. 206, n. 22, p. 4097-4103, 2003.

LISBOA, L. K.; SILVA, A. L. L.; PETRUCIO, M. M. Aquatic invertebrate's distribution in a freshwater coastal lagoon of Southern Brazil in relation to water and sediment characteristics. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 23, n. 2, p. 119-127, 2011.

MAHMOUD, B. H.; HEXSEL, C. L.; HAMZAVI, I. H.; LIM, H. W. Effects of visible light on the skin. *Photochemistry and Photobiology*, v. 84, n. 2, p. 450-462, 2008.

MAIONE, M.; GIOSTRA, U.; ARDUINI, J.; FURLANI, F.; GRAZIOSI, F.; VULLO, E. L.; BONASONI, P. Ten years of continuous observations of stratospheric ozone depleting gases at Monte Cimone (Italy) - Comments on the effectiveness of the Montreal Protocol from a regional perspective. *Science of the Total Environment*, v. 445, p. 155-164, 2013.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 75, n. 4, p. 469-486, 2003.

MEADOR, J.; JEFFREY, W.; KASE, J.; PAKULSKI, J.; CHIARELLO, S.; MITCHELL, D. Seasonal fluctuation of DNA photodamage in marine plankton assemblages at Palmer Station, Antarctica. *Photochemistry and Photobiology*, v. 75, n. 3, p. 266-271, 2002.

MEIER, P.; FINCH, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. *Nature*, v. 407, n. 6805, p. 796-801, 2000.

MIGUEL, N. C. O.; MEYER-ROCHOW, V. B.; ALLODI, S. Ultrastructural study of first and second order neurons in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Micron*, v. 33, n. 7, p. 627-637, 2002.

MOLINA, M. J.; ROWLAND, F. S. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atom-catalyzed destruction of ozone. *Nature*, v. 249, p. 810-812, 1974.

MORRISETTE, P. M. The evolution of policy responses to stratospheric ozone depletion. *Natural Resources Journal*, v. 29, p. 793-820, 1989.

MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E.; AMMAR, D.; FERREIRA, E. C.; BELTRAME, I.; PACHECO, C. Biologia dos Palaemonidae (Crustacea, Decapoda) da bacia hidrográfica de Ratones, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 16, p. 629-636, 1999.

MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S. Embryonic stages of the freshwater prawn *Macrobrachium olfersii* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, v. 23, n. 4, p. 869-875, 2003.

MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; NAZARI, E. M. Embryonic development of four species of palaemonid prawns (Crustacea, Decapoda): pre-naupliar, naupliar and post-naupliar periods. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, n. 1, p. 27-32, 2004.

NASSER, N. UVB: Susceptibility in malignant melanoma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 6, p. 843-848, 2010.

NAZARI, E. M.; SIMÕES-COSTA, M. S.; MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D.; DIAS, M. Comparisons of fecundity, egg size, and egg mass volume of the freshwater prawns *Macrobrachium potiuma* and *Macrobrachium olfersi* (Decapoda, Palaemonidae). *Journal of Crustacean Biology*, v. 23, n. 4, p. 862-868, 2003.

NAZARI, E. M.; AMMAR, D.; DE BEM, A. F.; LATINI, A.; MÜLLER, Y. M. R.; ALLODI, S. Effects of environmental and artificial UV-B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi* embryos. *Aquatic Toxicology*, v. 98, n. 1, p. 25-33, 2010.

NAZARI, E. M.; AMMAR, D.; MÜLLER, Y. M.; ALLODI, S. Impacts of ultraviolet-B radiation on aquatic embryos. *In: Exploring themes on aquatic toxicology*. Research Signpost, v. 1, p. 103-118, 2013.

NINOV, N.; MANJÓN, C.; MARTÍN-BLANCO, E. Dynamic control of cell cycle and growth coupling by ecdysone, EGFR, and PI3K signaling in *Drosophila* histoblasts. *Plos Biology*, v. 7, n. 4, p. 892-903, 2009.

PREVIDI, M.; POLVANI, L.M. Climate system response to stratospheric ozone depletion and recovery. *Quarterly Journal of the Royal Meteorological Society*, v. 140, n. 685, p. 2401-2419, 2014.

Nobel Prize. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1995/>. Acesso em: fevereiro de 2017.

QUADROS, T.; SCHRAMM, H.; ZENI, E.; SIMIONI, C.; ALLODI, S.; MÜLLER, Y.; AMMAR, D.; NAZARI, E. Developmental effects of exposure to ultraviolet B radiation on freshwater prawn *Macrobrachium olfersi*: mitochondria as target of environmental UVB radiation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 132, p. 279-287, 2016.

ROWLAND, F. S. Stratospheric ozone depletion. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 361, n. 1469, p. 769-790, 2006.

RUELAS, D. S.; KARENTZ, D.; SULLIVAN, J. T. Lethal and sub-lethal effects of UVB on juvenile *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 93, p. 192-200, 2006.

SANCAR, G. B.; SANCAR, A. Structure and function of DNA photolyases. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 12, p. 259-261, 1987.

SCHOLTZ, G.; PATEL, N.; DOHLE, W. Serially homologous engrailed stripes are generated via different cell lineages in the germ band of amphipod crustaceans (Malacostraca, Peracarida). *International Journal of Developmental Biology*, v. 38, p. 471-478, 1994.

SGARBI, F. C.; DO CARMO, E. D.; ROSA, L. F. B. Radiação ultravioleta e carcinogênese. *Revista de Ciências Médicas*, v. 16, n. 4/6, p. 245-250, 2007.

SHANKLIN, J. Reflections on the ozone hole. *Nature*, v. 465, n. 7294, p. 34-35, 2010.

SILVA, H. S. Análise espaço-temporal da expressão de proteínas envolvidas no processo apoptótico em embriões de camarão *Macrobrachium olfersi* expostos à radiação ultravioleta B. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 54 pp., 2015.

SINGH, M. K.; SHARMA, J. G.; CHAKRABARTI, R. Simulation study of natural UV-B radiation on *Catla catla* and its impact on physiology, oxidative stress, Hsp 70 and DNA fragmentation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 149, p. 156-163, 2015.

SIMÕES-COSTA, M. S.; PACHECO, C.; NAZARI, E. M.; MÜLLER, Y. M. R.; AMMAR, D. Estagiamento de embriões de *Macrobrachium olfersi* (Wiegman) (Crustacea, Palaemonidae) através de critérios morfológicos nos dias embrionários. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 22, p. 501-508, 2005.

SMITH, R. C.; PRÉZELIN, B. B.; BAKER, K. S.; BIDIGARE, R. R.; BOUCHER, N. P.; COLEY, T.; KARENTZ, D.; MACINTYRE, S.; MATLICK, H. A.; MENZIES, D.; ONDRUSEK, M.; WAN, Z.; WATERS, K. J. Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science*, v. 255, n. 5047, p. 952-959, 1992.

SOLA, Y.; LORENTE, J. Contribution of UVA irradiance to the erythema and photoaging effects in solar and sunbed exposures. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 143, p. 5-11, 2015.

STICCA, S. C. Organização trófica da assembleia de peixes de uma lagoa costeira subtropical (Santa Catarina, Brasil). Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 45 pp., 2013.

STOLARSKI, R. S.; CICERONE, R. J. Stratospheric chlorine: a possible sink for ozone. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 52, n. 8, p. 1610-1615, 1974.

SUZANNE, M.; STELLER, H. Shaping organisms with apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, v. 20, n. 5, p. 669-675, 2013.

TIETGE, J. E.; DIAMOND, S. A.; ANKLEY, G. T.; DEFOE, D. L.; HOLCOMBE, G. W.; JENSEN, K. M.; HAMMER, E. Ambient solar UV radiation causes mortality in larvae of three species of *Rana* under controlled exposure conditions. *Photochemistry and Photobiology*, v. 74, p. 261-268, 2001.

VARGAS, M. A.; GEISH, M. A.; MACIEL, F. E.; CRUZ, B. P.; FILGUEIRA, D. D. M. V. B.; DE JESUS FERREIRA, G.; NERY, L. E. M.; ALLODI, S. Influence of the dark/light rhythm on the effects of UV radiation in the eyestalk of the crab *Neohelice granulata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, v. 151, n. 3, p. 343-350, 2010.

WOFSY, S. C.; MCELROY, M. B.; YUNG, Y. L. The chemistry of atmospheric bromine. *Geophysical Research Letters*, v. 2, n. 6, p. 215-218, 1975.

WON, E. J.; LEE, Y.; HAN, J.; HWANG, U. K.; SHIN, K. H.; PARK, H. G.; LEE, J. S. Effects of UV radiation on hatching, lipid peroxidation, and fatty acid composition in the copepod *Paracyclopina nana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, v. 165, p. 60-66, 2014.

YUNG, Y. L.; PINTO, J. P.; WATSON, R. T.; SANDER, S. P. Atmospheric bromine and ozone perturbations in the lower stratosphere. *Journal of the Atmospheric Sciences*, v. 37, n. 2, p. 339-353, 1980.

ZENI, E. C.; AMMAR, D.; LEAL, M. L.; SILVA, H. S.; ALLODI, S.; MÜLLER, Y. M. R.; NAZARI, E. M. Light-mediated DNA repair prevents UVB-induced cell cycle arrest in embryos of the crustacean *Macrobrachium olfersi*. *Photochemistry and Photobiology*, v. 91, p. 869-878, 2015.

ZHOU, L.; STELLER, H. Distinct pathways mediate UV-induced apoptosis in *Drosophila* embryos. *Developmental Cell*, v. 4, n. 4, p. 599-605, 2003.